# MycAssay™ Aspergillus
## Roche LightCycler® 2.0
## Échantillons Respiratoires
**REF 080-045**

## Usage prévu

L'utilisation de MycAssay™ Aspergillus, réservée au personnel de laboratoire qualifié, est indiquée pour la détection qualitative d'ADN génomique d'*Aspergillus* spp. extrait d'échantillons respiratoires des voies respiratoires inférieures (par exemple, échantillons bronchiques) comme aide au diagnostic chez les patients adultes suspects d'infection ou d'allergie à *Aspergillus*.

Le test MycAssay™ Aspergillus a été validé pour une utilisation sur l'automate Roche LightCycler® 2.0.

## Résumé et explication

*Aspergillus* spp. est une moisissure opportuniste ubiquiste qui provoque des syndromes à la fois allergiques et invasifs. Ce genre se décline en 300 espèces environ, parmi lesquelles 41 sont associées à des maladies chez l'homme. La majorité des infections sont provoquées par *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* et *A. niger*. Moins couramment, *A. nidulans* et d'autres espèces rares telles qu'*A. sydowii, A. versicolor, A. lentulus et A. pseudofischeri* sont impliquées [1]. La plupart des infections et des allergies dues à *Aspergillus* spp. affectent les voies respiratoires. Les syndromes allergiques incluent notamment l'aspergillose bronchopulmonaire allergique et la sinusite aspergillaire allergique, généralement dues à *A. fumigatus*. Les aspergilloses pulmonaires chroniques comprennent l'aspergillome, l'aspergillose pulmonaire cavitaire chronique et l'aspergillose fibrosante chronique. L'aspergillose invasive apparaît chez les groupes de patients à risque, notamment ceux traités par corticoïdes et ceux atteints de neutropénie ou de dysfonctionnement du système phagocytaire (c'est-à-dire granulomatose chronique ou infection à VIH). Environ 80 % des cas d'aspergillose invasive touchent les poumons [2].

Le diagnostic général de l'aspergillose pulmonaire invasive inclut un examen de tomodensitométrie (TDM), une bronchoscopie et un lavage broncho-alvéolaire (observation sous microscopie et culture), une recherche de l'antigène d'*Aspergillus* dans le sang ou un examen histologique d'échantillons prélevés par biopsie. Dans ce cas de figure, les cultures sont souvent faussement négatives [3]. En effet, le lavage broncho-alvéolaire donne un résultat positif par culture dans environ 40 % des cas seulement, même lorsque le diagnostic a été confirmé par d'autre moyens [4,5,6,7], ce qui traduit le manque de sensibilité de la culture pour la détection de l'aspergillose invasive et de l'aspergillose pulmonaire chronique. Néanmoins, les cultures sont importantes lorsqu'elles sont positives car la plupart des tests de diagnostic n'indique ni le genre, ni l'espèce du champignon responsable de la maladie ni le profil de sensibilité de l'isolat qui entraîne l'infection.

L'aspergillose bronchopulmonaire allergique complique l'asthme et la mucoviscidose [8] et apparaît rarement sans affection sous-jacente. La plupart des cas sont associés à l'*A. fumigatus*. Occasionnellement, d'autres champignons sont impliqués. Cette maladie est caractérisée par un encombrement épisodique des voies aériennes par d'épais bouchons d'expectorations contenant de nombreuses hyphes d'*Aspergillus*, un taux d'IgE totales sériques > 1 000 IU/mL et des anticorps IgE et IgG détectables spécifiques d'*A. fumigatus* ou un test positif de la piqûre épidermique par *Aspergillus*. Les cultures d'expectorations peuvent être positives pour *A. fumigatus* et la bronchectasie est visible sur un tomodensitogramme de la poitrine.

[1] Base de données des espèces sur www.aspergillus.org.uk
[2] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. Medical Mycology: 43 (suppl. 1): S207-38.
[3] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. (2005). Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet Infectious Diseases: 9: 609-22.
[4] Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. (1992). The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Respir Med: 86: 243-8.
[5] Greub G and Bille J. (1998) Aspergillus species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to deteremine significance. Clin Microbiol Infect 4: 710-716.
[6] Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L,Chapman SW, Morrison VA, Pappas P, Hiemenz JW, Stevens DA, and the Mycoses Study Group. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: A hospital-based survey of Aspergillosis. Clinical Infectious Diseases; 33:1824–33.
[7] Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. (2002). Use of Circulating Galactomannan Screening for Early Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients The Journal of Infectious Diseases. 186:1297–306.
[8] Tillie-Leblond I, Tonnel AB. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Allergy: 60: 1004-13.

Les méthodes actuelles de diagnostic de l'aspergillose pulmonaire chronique font appel à la fois à la radiologie (qui n'est pas spécifique) [9] et à la sérologie (anticorps IgG d'Aspergillus ou précipitines) qui se révèle positive avec la plupart des formes d'aspergillose (et qui n'est donc pas spécifique d'une manifestation particulière d'aspergillose) [1]. Les cultures donnent des résultats positifs dans seulement 40 à 65 % des cas confirmés par radiologie ou sérologie [10,11]. Dans la mesure où le diagnostic différentiel est vaste et inclut notamment la tuberculose, les mycobactérioses atypiques, la sarcoïdose, l'histoplasmose, la coccidioïdomycose, la pneumoconiose, le poumon rhumatoïde, la pelvispondylite rhumatismale et d'autres, il est important d'établir la présence d'*Aspergillus* spp. dans les échantillons respiratoires afin d'éviter tout retard de diagnostic de l'aspergillose et les traitements inadaptés.

MycAssay™ Aspergillus est un kit de diagnostic moléculaire qui repose sur la détection de l'ADN génomique d'*Aspergillus* spp. par la technologie de la PCR en temps réel à balises moléculaires [12]. Le mode opératoire complet, extraction d'ADN de l'échantillon clinique comprise, peut être réalisé en 4 heures alors que la méthode par culture peut prendre plusieurs jours pour produire des résultats positifs. Ce test présente plusieurs avantages par rapport aux méthodes de diagnostic actuelles de l'aspergillose invasive aiguë et de l'aspergillose pulmonaire chronique, notamment une détection plus rapide d'*Aspergillus* spp. et une augmentation potentielle de la sensibilité à *Aspergillus spp.* chez les patients fortement immunodéprimés suspects d'aspergillose pulmonaire invasive.

## Principes de la méthode

Après mélange des réactifs du kit MycAssay™ Aspergillus avec un échantillon contenant la séquence cible d'ADN d'*Aspergillus* (une partie du gène ribosomal 18S d'*Aspergillus*), un cycle thermique entraîne l'amplification de l'ADN. Le test utilise également un contrôle interne d'amplification (IAC pour Internal Amplification Control), un fragment d'ADN non présent dans le génome des Aspergillus, d'autres champignons, des bactéries ni de l'homme, pour détecter les substances inhibitrices de la PCR et confirmer la fonctionnalité des réactifs.

Les cibles d'ADN amplifiées sont détectées par des balises moléculaires. Il s'agit de sondes d'hybridation oligonucléotidiques monobrins qui forment une structure tige-boucle. La boucle contient une séquence de la sonde complémentaire à la séquence de la cible, tandis que la tige est formée par annelage de séquences latérales complémentaires de part et d'autre de la séquence de la sonde. Un fluorophore, qui émet de la fluorescence lorsqu'il est excité par une lumière de longueur d'onde adaptée, est fixé par liaison covalente à une extrémité d'un bras et un extincteur de fluorescence, qui inhibe la fluorescence du fluorophore lorsqu'il en est physiquement proche, est fixé par liaison covalente à l'extrémité de l'autre bras. Libres en solution, les balises moléculaires ne sont pas fluorescentes. Par contre, lors de l'hybridation avec un brin d'acide nucléique contenant une séquence cible, elles subissent un changement de conformation qui sépare le fluorophore et l'extincteur de fluorescence, ce qui les rend fluorescentes lorsqu'elles sont excitées. L'intensité de la fluorescence pendant un cycle donné, ou après un cycle, dépend de la quantité d'amplicons spécifiques présents à ce moment. L'automate de PCR en temps réel surveille simultanément la fluorescence émise par toutes les balises.

## Précautions

- L'utilisation du kit est réservée aux professionnels de laboratoire. Les modes opératoires doivent être suivis de manière à éviter la production d'aérosols lors de la manipulation des échantillons. Il convient d'observer les précautions habituelles et les recommandations en vigueur dans l'établissement lors de la manipulation des échantillons. Une fiche de données de sécurité est disponible auprès de Myconostica Ltd.
- Ce test est réservé au diagnostic *in vitro*.
- Ce test est réservé à une utilisation sur l'automate Roche LightCycler® 2.0 avec le logiciel LightCycler® v4.1.
- Ne pas utiliser les réactifs ni les témoins si les sachets protecteurs sont ouverts ou endommagés à la livraison.
- Les réactifs et les témoins ne sont pas interchangeables d'un lot à un autre.
- Ne jamais mélanger les réactifs ou les témoins provenant de différents tubes, même s'ils sont du même lot.
- Ne jamais utiliser les réactifs ni les témoins au-delà de la date d'expiration.
- Il convient de ne pas recongeler ni réutiliser les réactifs et les témoins après ouverture.
- Porter des vêtements de protection et des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit.
- Éviter la contamination des réactifs par les microbes et la désoxyribonucléase (DNAse) lors du prélèvement des parties aliquotes des tubes.

[9] Greene R. (2005). The radiological spectrum of pulmonary aspergillosis. Med Mycol: 43 (Suppl 1): S147-54.
[10] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. (2003). Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: Case series, proposed nomenclature and review. Clin Infect Dis: 37 (Suppl 3): S265-80.
[11] Camuset J, Lavolé A, Wislez M, Khalil A, Bellocq A, Bazelly B, Mayaud C, Cadranel J. (2007). Bronchopulmonary aspergillosis infections in the non-immunocompromised patient. Rev Pneumol Clin. 63:155-166.

[12] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

- Il est recommandé d'utiliser des embouts pour pipettes stériles, exempts de DNAse et à usage unique de type filtres à faible rétention ou à déplacement direct.
- Utiliser un embout neuf pour chaque échantillon et chaque réactif.
- Mettre au rebut les réactifs inutilisés et les déchets conformément à la réglementation nationale, régionale et locale en vigueur.
- Afin d'éviter la contamination par les amplicons d'*Aspergillus* et de l'IAC, ne pas ouvrir les tubes réactionnels après amplification.
- L'analyse de témoins supplémentaires peut être exigée par les recommandations ou la réglementation nationale, régionale et/ou locale en vigueur ou par l'organisme d'agrément.
- Ne pas manger, boire ni fumer à proximité des zones de manipulation des échantillons et des réactifs.
- L'ADN à faible concentration peut être instable s'il n'est pas conservé correctement. Il est recommandé de conserver l'ADN extrait des échantillons cliniques à -80 °C afin d'en préserver l'intégrité. Dans la mesure du possible, il convient également d'éviter la décongélation et la recongélation répétées.

## Contenu du kit

Description

Le kit est constitué de 5 sachets en aluminium, à 3 compartiments, scellés, utilisables individuellement. Chaque sachet contient les quantités nécessaires de réactifs pour réaliser 8 réactions.

| | | Volume |
|---|---|---|
| **Tube 1** (bouchon orange) | dNTP<br>$MgCl_2$<br>Solution tamponnée de complexe d'ADN polymérases | 66 µL |
| **Tube 2** (bouchon vert) | < 0,01 % d'amorces<br>< 0,01 % de balises moléculaires<br>< 0,0001 % d'IAC<br>L'IAC est un plasmide recombinant contenant une séquence non infectieuse et sans relation avec la séquence cible (*Aspergillus*).<br>Tampon Tris/HCl | 66 µL |
| **Tube 3** (bouchon transparent) | Témoin négatif<br>Eau | 25 µL |
| **Tube 4** (bouchon noir) | Témoin positif<br>< 0,0001 % d'ADN témoin positif<br>La molécule du témoin positif est un plasmide recombinant contenant la séquence cible d'*Aspergillus*.<br>Tampon Tris/HCl | 25 µL |

Autres éléments contenus dans le kit :

- CD-ROM du mode opératoire du test MycAssay™ Aspergillus Myconostica
- Mode d'emploi
- Certificat d'analyse

## Conservation

Il convient de conserver le kit au congélateur (de -15 °C à -25 °C) jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette de la boîte du kit, date au-delà de laquelle il convient de mettre le kit au rebut conformément à la réglementation locale en vigueur.

Le contenu d'un sachet doit être utilisé immédiatement après ouverture. Ne pas le recongeler ni le réutiliser ultérieurement.

## Équipement et matériel nécessaires et non fournis

- Automate de PCR en temps réel Roche LightCycler® 2.0 (avec manuel d'utilisation, ordinateur relié et logiciel LightCycler® version 4.1)
- Centrifugeuse à carrousel LightCycler 2.0 (adaptateurs de capillaires pour minicentrifugeuse facultatifs)
- Carrousel d'échantillons pour capillaires de 20 µL
- Capillaires LightCycler 2.0 de 20 µl munis de bouchons
- Portoir pour capillaires
- Éjecteur de capillaires
- Dispositif de bouchage
- Microcentrifugeuse
- Agitateur vortex
- Micropipettes (volumes de 7,5 µL à 20 µL)
- Embouts filtres stériles à faible rétention
- Gants à usage unique, non poudrés
- Solution de décontamination de l'ADN exclusive
- Kit d'isolement d'ADN (voir ci-dessous)
- Kit MycAssay™ CC (voir ci-dessous)

## Échantillon

L'échantillon à soumettre au test MycAssay™ Aspergillus est l'ADN génomique total des échantillons cliniques de LBA et d'autres échantillons des voies respiratoires inférieures. À cette fin, il est recommandé d'utiliser le kit d'isolement et l'équipement suivants, employés pour la validation du test :

- Kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra™ (RÉF. 080-005 disponible auprès de Myconostica)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., New York, États-Unis)
- Adaptateur vortex (RÉF. 080-015 disponible auprès de Myconostica)

## Kit MycAssay Colour Compensation (CC)

L'analyse précise des données obtenues par le test MycAssay™ Aspergillus exige l'application d'un fichier de compensation colorimétrique généré à l'aide du kit Myconostica MycAssay CC [réf. 080-080]. Une fois créé, le fichier peut être appliqué à plusieurs analyses réalisées sur le même automate. Pour en savoir plus, contacter le distributeur local.

## Remarques sur le mode opératoire

- Lire le mode opératoire dans son intégralité avant de commencer.
- La durée totale du mode opératoire du test MycAssay™ Aspergillus (extraction d'ADN exclue) est d'environ 2 heures, selon le nombre d'échantillons analysés.
- Il convient de préparer le test sur un poste de travail pour PCR ou dans un laboratoire pré-PCR. Si aucun poste de travail pour PCR n'est disponible, il convient de préparer le test dans une zone dédiée du laboratoire [13], séparée des zones utilisées pour l'extraction d'ADN et nettoyée régulièrement avec un agent de décontamination de l'ADN.
- Toutefois, les agents de décontamination de l'ADN sont susceptibles d'inhiber la réaction du test. Il faut donc éviter leur utilisation lors de la préparation de la PCR en temps réel.
- Transvaser les liquides au moyen de micropipettes. Il convient d'utiliser des micropipettes dédiées à la préparation des réactions et de les décontaminer régulièrement.
- Il est recommandé d'utiliser des embouts filtres à faible rétention afin d'éviter toute perte d'ADN pendant la phase de préparation.
- **Manipuler le Tube 4 avec précaution. Il contient un témoin positif à base d'ADN qui, en cas de contamination, risque de donner des résultats faussement positifs.**
- Toujours porter des gants.
- Tous les tubes réactionnels doivent être bouchés après utilisation et avant mise au rebut.
- Noter précisément la position de tous les capillaires contenant les échantillons sur le carrousel à 32 positions sur un plan d'essai.
- L'analyse précise des données exige l'application d'un fichier de compensation colorimétrique généré à l'aide du kit Myconostica MycAssay CC.

[13] Voir par exemple Miffin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

## Mode opératoire

### 1. Préparation de la PCR en temps réel

1.1 Pour commencer, mettre en marche le système de PCR en temps réel LightCycler® 2.0 (automate, ordinateur relié et centrifugeuse) et lancer le logiciel correspondant. Saisir le nom d'utilisateur et le mot de passe et sélectionner la base de données Diagnostic. S'il s'agit de la première analyse de la journée, lancer un autotest de l'automate avant de configurer une analyse.

1.2 **Rappel :** Un cycle de compensation colorimétrique doit avoir lieu avant d'analyser les résultats du test MycAssay™ Aspergillus sur LightCycler® 2.0. Toutefois, il n'est pas impératif de lancer le cycle avant d'utiliser le présent produit. Le cycle peut être réalisé et appliqué aux fichiers d'analyse rétrospectivement.

1.3 Vérifier que le plan de travail a été nettoyé à l'aide d'un agent de décontamination de l'ADN et qu'il est sec. Éviter cependant l'utilisation de tels agents pendant la préparation du test car un excès de solution nettoyante peut inhiber la PCR.

1.4 Un sachet contient un Tube 1, un Tube 2, un Tube 3 et un Tube 4. Chaque sachet contient les quantités nécessaires de réactifs pour réaliser 8 réactions. Pour chaque passage, au moins une réaction avec un témoin positif et une réaction avec un témoin négatif doivent être réalisées avec les réactifs d'un même lot du kit. Un sachet permet ainsi d'analyser 6 échantillons de patient. S'il y a plus de 6 échantillons à analyser, plusieurs sachets peuvent être utilisés, à condition que ceux-ci proviennent du même lot du kit. Toutefois, la capacité de l'automate LightCycler® 2.0 est limitée à 32 échantillons par analyse. Par conséquent, un maximum de 30 échantillons de patient peuvent être analysés en un seul cycle (4 sachets).

1.5 Calculer le nombre de réactions requises en se reportant au tableau ci-dessous :

| Nombre de sachets | Nombre maximum d'échantillons de patient |
|---|---|
| 1 | 6 |
| 2 | 14 |
| 3 | 22 |
| 4 | 30 |

1.6 Sortir le nombre adapté de sachets du congélateur. Ne pas utiliser un sachet non scellé. En cas de congélation des échantillons de patient après extraction, sortir également ceux-ci du congélateur.

1.7 Ouvrir le nombre nécessaire de sachets en les déchirant et en extraire les tubes. En cas d'utilisation de plusieurs sachets mais d'analyse d'un seul jeu de témoins positif et négatif, les Tubes 3 et 4 ne doivent être retirés que d'un seul sachet. **Manipuler le Tube 4 avec précaution. Il contient un témoin positif à base d'ADN qui, en cas de contamination, risque de donner des résultats faussement positifs.**

1.8 Laisser le contenu des tubes décongeler à température ambiante pendant 5 à 10 minutes. Vérifier que le contenu de chaque tube est entièrement décongelé avant utilisation. Agiter les tubes et les échantillons de patient au vortex pour en mélanger le contenu puis centrifuger brièvement dans une microcentrifugeuse pour s'assurer qu'il ne reste pas de dépôt au fond des tubes avant utilisation.

1.9 Placer le nombre requis de capillaires de 20 µL sur le portoir. Veiller à ne laisser aucune trace sur le verre.

1.10 Préparer toujours le témoin négatif en premier, suivi des échantillons de patients. Il convient de toujours préparer le témoin positif en dernier.

1.11 Les volumes de réactifs et d'ADN sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

| Réactif | Réaction | | |
|---|---|---|---|
| | Témoin négatif | Échantillons de patient | Témoin positif |
| **Tube 1 (bouchon orange)** | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| **Tube 2 (bouchon vert)** | 7,5 µL | 7,5 µL | 7,5 µL |
| **Tube 3 (bouchon transparent)** | 10 µL | - | - |
| **Échantillons de patient** | - | 10 µL | - |
| **Tube 4 (bouchon noir)** | - | - | 10 µL |
| Volume total | 25 µL | 25 µL | 25 µL |

1.12 Ajouter les réactifs dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessus : Tube 1 suivi du Tube 2 puis de la matrice (témoin négatif, échantillon de patient ou témoin positif). Faire preuve de précaution lors du prélèvement des

parties aliquotes du Tube 1 ; le liquide est légèrement visqueux et peut adhérer à la paroi interne du tube. Si c'est le cas, procéder à une nouvelle centrifugation pour recueillir le reste du contenu dans le fond du tube avant de tenter de prélever les dernières parties aliquotes.

1.13 Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque transfert de liquide. Après utilisation, reboucher chaque tube réactionnel et jeter immédiatement le tube et le contenu restant dans un conteneur à déchets cliniques scellable. Il est impossible de conserver les réactifs inutilisés pour un usage ultérieur.

1.14 Faire preuve d'une extrême précaution lors du prélèvement à la pipette dans le Tube 4 (ADN témoin positif) afin de ne pas contaminer d'autres réactions. Le bouchage de tous les autres capillaires avant ouverture du Tube 4 peut réduire le risque de contamination croisée.

1.15 Boucher avec précaution les capillaires à l'aide des bouchons fournis et du dispositif de bouchage. Vérifier que les capillaires sont bien bouchés. Le bouchage peut intervenir après l'ajout de la matrice dans le mélange réactionnel afin de réduire le risque de contamination croisée et de contamination de l'environnement.

1.16 En l'absence d'une centrifugeuse à carrousel, centrifuger les échantillons dans une minicentrifugeuse à l'aide des adaptateurs fournis avec le portoir. Sinon, passer à la Section 1.17.

1.17 Transférer tous les capillaires sur le carrousel avec le plus grand soin, dans l'ordre des positions sur le portoir, en plaçant le premier capillaire sur la position 1 et en poursuivant dans l'ordre croissant sans laisser d'espace vide. Pousser chaque capillaire à fond vers le bas jusqu'à ce qu'il tienne fermement en place.

1.18 S'ils n'ont pas encore été centrifugés (etape 1.16), centrifuger les échantillons sur la centrifugeuse à carrousel LightCycler 2.0.

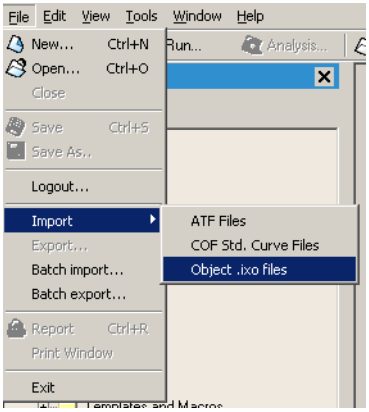
1.19 Passer aussitôt à la Section 2. Les réactions du test MycAssay™ Aspergillus restent stables à température ambiante pendant un maximum de 60 minutes.

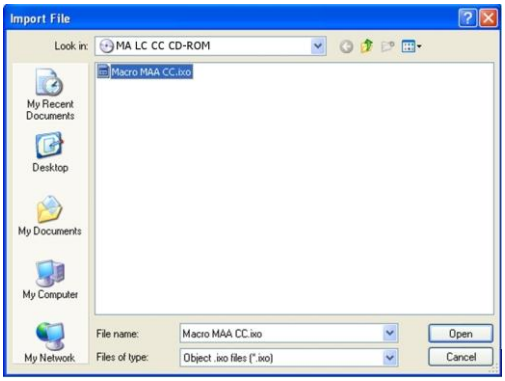
1.20 Après préparation de la PCR, nettoyer soigneusement le plan de travail à l'aide d'un agent de décontamination de l'ADN.

## 2. Réalisation de l'analyse

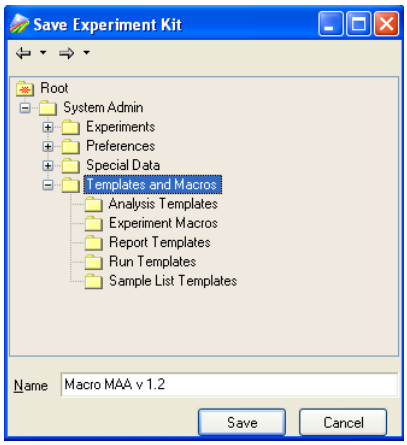
2.1 Introduire le **CD-ROM du mode opératoire du test MycAssay Aspergillus Myconostica**.

2.2 Dans le menu **File**, sélectionner **Import** puis **Object .ixo files**. Importer le fichier **Macro MAA v1.2.ixo** du CD dans la base de données.



2.3 Dans le menu **File**, sélectionner **Save** et enregistrer le macro à l'emplacement souhaité de la base de données.

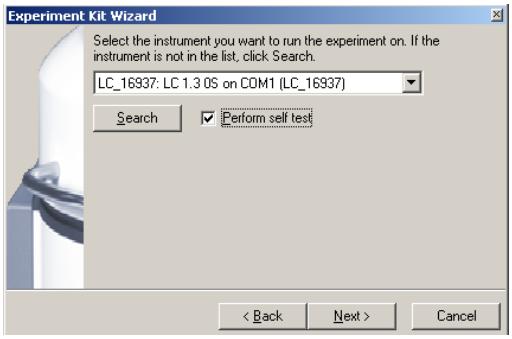



2.4 Sélectionner l'option **Run Macro** dans la barre d'outils.

2.5 Sélectionner le fichier de modèle **Macro MAA v1.2** puis cliquer sur **Open**.

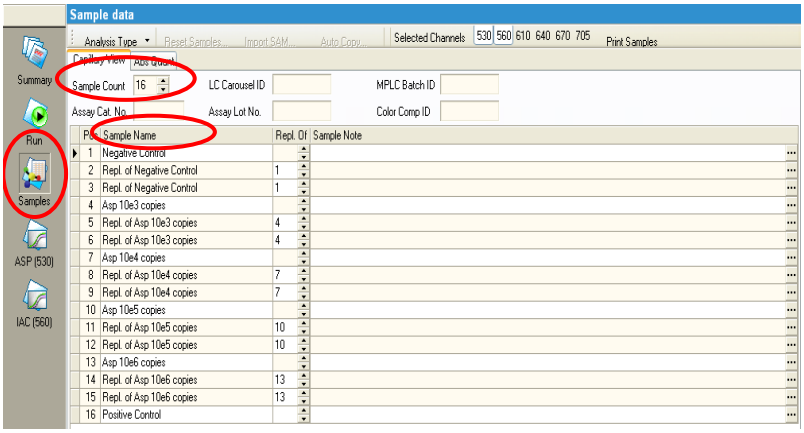
2.6 Suivre les instructions de l'assistant. S'il s'agit de la première analyse de la journée, cocher la case **Perform Self-Test**.

Experiment Kit Wizard
Welcome to the Experiment Kit Wizard.
The Experiment Kit Wizard helps you run a new experiment using the provided kit. The first step is to create the new experiment.
To start the wizard and create a new experiment, click Next.
If you don't want to create a new experiment at this time, click Cancel.
< Back
Next >
Cancel


Experiment Kit Wizard
Select the instrument you want to run the experiment on. If the instrument is not in the list, click Search.
LC_16937: LC 1.3 OS on COM1 (LC_16937)
Search
Perform self test
< Back
Next >
Cancel

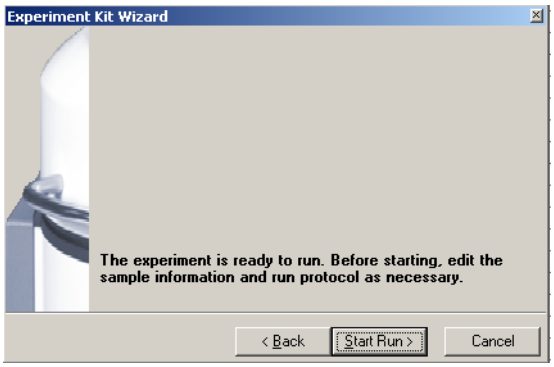
2.7 Nommer et enregistrer le fichier d'analyse à l'emplacement souhaité.

2.8 Accéder à la section **Samples** en cliquant sur l'onglet correspondant à gauche de l'écran. Modifier le nombre d'échantillons dans la case **Samples Count** et les noms des échantillons dans l'onglet **Capillary view**. Nommer les échantillons conformément au plan de l'essai et aux positions sur le carrousel.



2.9 Placer le carrousel contenant les échantillons centrifugés sur l'automate LightCycler 2.0. Veiller à enclencher l'axe de l'enceinte thermique dans l'encoche située sous la position 1 sur le carrousel. Vérifier que le carrousel est bien introduit dans l'enceinte et fermer le couvercle.

2.10 Une fois l'opération terminée, cliquer sur le bouton **Start**. S'assurer que l'automate a identifié tous les capillaires présents sur le carrousel et que le programme a démarré.

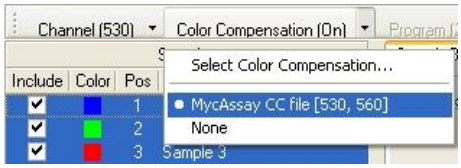



## 3. Analyse et interprétation des données

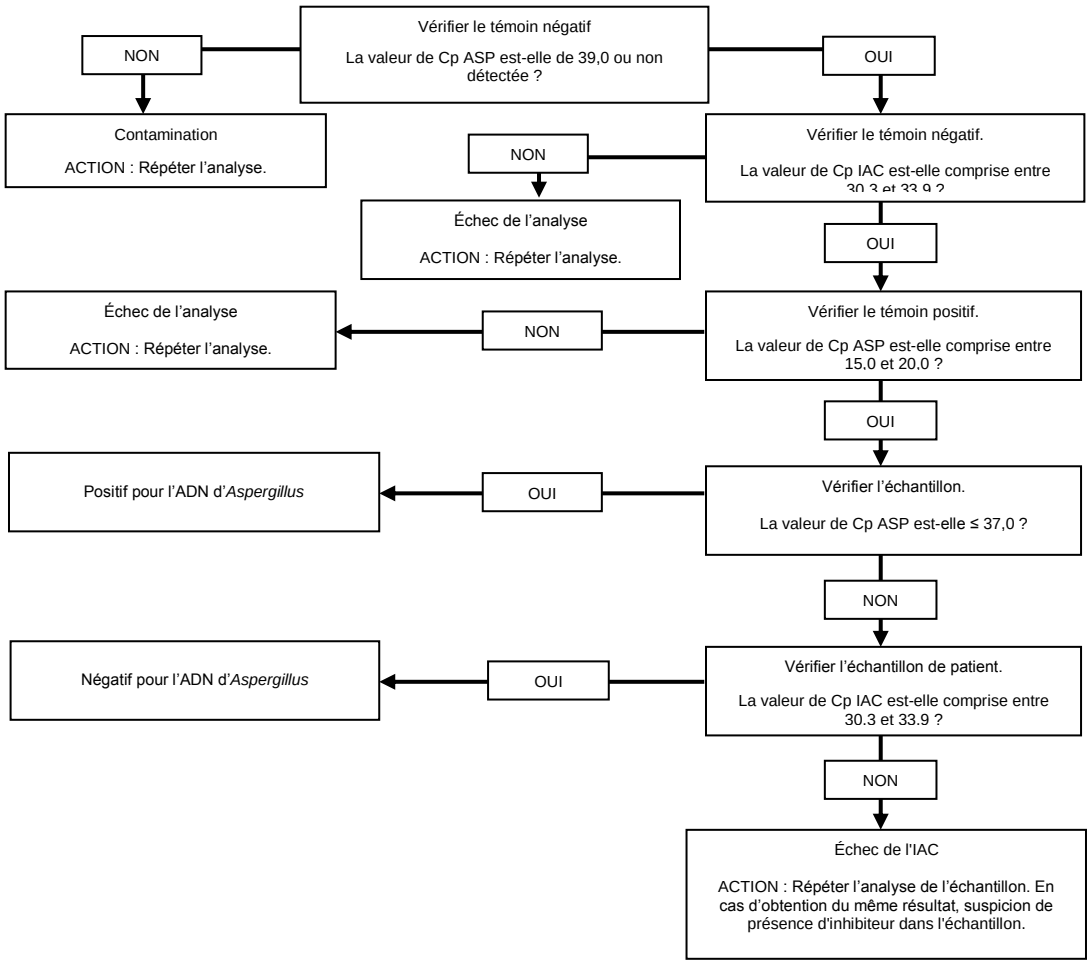
3.2 **Rappel :** Un fichier de compensation colorimétrique doit être appliqué avant d'analyser les résultats du test MycAssay™ Aspergillus sur LightCycler® 2.0. Si aucun fichier n'a été créé pour l'instant, en créer un avant de procéder à l'analyse des données et à l'interprétation.
Une fois l'analyse terminée, vérifier le contenu du rapport affiché à l'écran et l'imprimer si nécessaire.

3.3 Les résultats pour Aspergillus se trouvent dans la section d'analyse des **Agents pathogènes (530)** et les résultats pour l'IAC dans la section d'analyse **IAC (560)**.

3.4 Dans les deux sections, **ASP (530)** et **IAC (560)**, sélectionner le fichier de compensation colorimétrique (**MycAssay CC file**) à appliquer à l'analyse.




3.5 Analyser chaque échantillon, en commençant par les témoins, comme indiqué dans l'organigramme ci-dessous (plus d'informations sont fournies dans le tableau situé en dessous de l'organigramme).


Vérifier le témoin négatif
La valeur de Cp ASP est-elle de 39,0 ou non détectée ?
NON
OUI
Contamination
ACTION : Répéter l'analyse.
NON
Vérifier le témoin négatif.
La valeur de Cp IAC est-elle comprise entre 30,3 et 33,9 ?
Échec de l'analyse
ACTION : Répéter l'analyse.
OUI
Échec de l'analyse
ACTION : Répéter l'analyse.
NON
Vérifier le témoin positif.
La valeur de Cp ASP est-elle comprise entre 15,0 et 20,0 ?
OUI
Positif pour l'ADN d'*Aspergillus*
OUI
Vérifier l'échantillon.
La valeur de Cp ASP est-elle ≤ 37,0 ?
NON
Négatif pour l'ADN d'*Aspergillus*
OUI
Vérifier l'échantillon de patient.
La valeur de Cp IAC est-elle comprise entre 30.3 et 33.9 ?
NON
Échec de l'IAC
ACTION : Répéter l'analyse de l'échantillon. En cas d'obtention du même résultat, suspicion de présence d'inhibiteur dans l'échantillon.

| Échantillon | Cp agent pathogène (530) | Cp IAC (560) | Interprétation | Action nécessaire |
|---|---|---|---|---|
| Témoin négatif | 39,0 ou Cp non détectée | Entre 30,3 et 33,9 | Témoin négatif acceptable | Les résultats patient sont valides. |
| Témoin négatif | 39,0 ou Cp non détectée | < 30,3 ou > 33,9 | Échec du témoin négatif | Répéter toute l'analyse. |
| Témoin négatif | < 39,0 | Entre 30,3 et 33,9 | Contamination | Répéter toute l'analyse. |
| Témoin positif | Entre 15,0 et 20,0 | Sans objet | Témoin positif acceptable | Les résultats patient sont valides. |
| Témoin positif | < 15,0 ou > 20,0 | Sans objet | Échec du témoin positif | Répéter toute l'analyse. |
| Échantillon de patient | ≥ 39,0 ou Cp non détectée | Entre 30,3 et 33,9 | Négatif pour *Aspergillus* | Résultat à mentionner dans le rapport : Résultat 1 |
| Échantillon de patient | ≤ 37,0 | Sans objet | Positif pour *Aspergillus* | Résultat à mentionner dans le rapport : Résultat 2 |
| Échantillon de patient | 39,0 ou Cp non détectée | < 30,3 ou > 33,9 | Échec de l'IAC dans l'échantillon | Répéter l'analyse de l'échantillon. Résultat 3 |

*VLC = valeur limite clinique. Tous les résultats inférieurs ou égaux à cette valeur sont considérés comme positifs d'un point de vue clinique. Les autres échantillons peuvent présenter une valeur Cp > 37,0, ce qui traduit un niveau normal ou naturel d'*Aspergillus* dans l'échantillon respiratoire.

*Pour en savoir plus sur les Résultats 1, 2 et 3, voir la section Rapport clinique.

# 4. Dépannage

### 4.1 Le témoin négatif a émis un signal positif dans la voie 530 :

- Une contamination s'est produite pendant la préparation. Aucun des résultats de l'analyse n'est fiable.

→ Répéter toute l'analyse en faisant preuve de précaution lors de l'ajout des matrices, en particulier du témoin positif (Tube 4) pour éviter toute contamination croisée.

→ Veiller à ce que le plan de travail et l'équipement soient bien décontaminés avant et après utilisation.

- Le témoin négatif a été mal positionné sur l'automate.

→ Veiller à correctement nommer les capillaires dans le logiciel.

### 4.2 La valeur Cp de l'IAC du témoin négatif ne se trouve pas dans la plage acceptable :

- La PCR a été inhibée.

→ Vérifier que le plan de travail et l'équipement soient complètement secs après nettoyage avec un agent de décontamination et avant préparation de la PCR.

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section « Conservation » du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- Le réactif du Tube 1 ou du Tube 2 n'a pas été ajouté au mélange réactionnel pour PCR ou deux fois trop de réactif du Tube 2 a été ajouté.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide d'un capillaire réactionnel est plus élevé ou plus bas que celui des autres capillaires.

- Un fichier de compensation colorimétrique erroné a été appliqué aux données.

→ Créer un fichier de compensation colorimétrique à l'aide du kit Myconostica MycAssay CC et l'appliquer aux résultats avant de les analyser à nouveau. Pour en savoir plus sur ce kit, contacter le distributeur local.

### 4.3 Le témoin positif donne un résultat négatif :

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section « Conservation » du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- Une erreur s'est produite au cours des étapes 1.11 à 1.13 et la matrice du témoin positif (Tube 4) a été placée dans le mauvais tube réactionnel.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide d'un tube réactionnel est plus élevé que celui d'un autre.

- Le réactif du Tube 1 ou du Tube 2 n'a pas été ajouté au mélange réactionnel.

→ Répéter l'analyse en faisant preuve de précaution lors de la phase de préparation. De telles erreurs sont détectables lorsque le niveau de liquide de ce capillaire réactionnel est plus bas que celui des autres capillaires.

- Le témoin positif a été mal positionné sur l'automate.

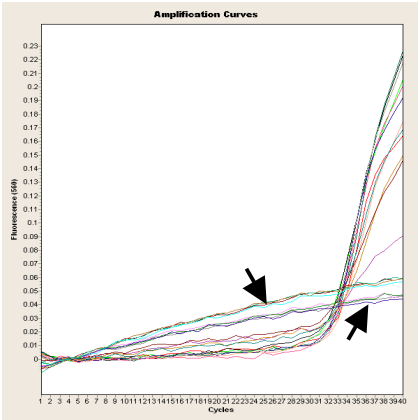
→ Veiller à correctement nommer les capillaires dans le logiciel.

**4.4 Les échantillons patient sont négatifs et l'IAC se trouve en dehors de la plage acceptable (Résultat 3) :**

- Il est probable que les échantillons de patient contiennent des inhibiteurs de la PCR.

→ Il est recommandé d'extraire l'ADN des échantillons à l'aide du kit d'extraction d'ADN fongique MycXtra™.

**4.5 L'échantillon patient est négatif dans la section ASP (530) et la courbe de l'IAC (560) présente un écart significatif par rapport à la ligne de base habituelle (comme illustré sur l'image ci-dessous, les flèches indiquant les tracés anormaux) :**




- La PCR a été inhibée.

→ Vérifier que le plan de travail et l'équipement soient complètement secs après nettoyage avec un agent de décontamination et avant préparation de la PCR.

→ Répéter l'analyse de l'échantillon patient. Si le problème persiste, l'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. Mentionner cet échantillon comme indéterminé dans le rapport.

**4.6 Les résultats de la section IAC (560) sont presque identiques à ceux de la section de l'agent pathogène (530).**

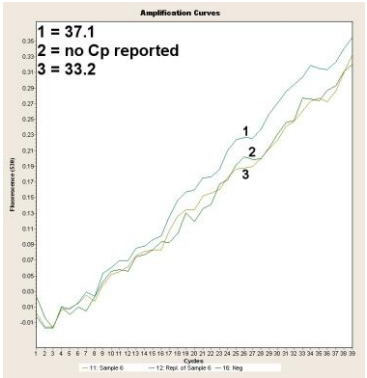
- Aucun fichier de compensation colorimétrique n'a été appliqué aux résultats d'essai ou un fichier erroné a été appliqué.

→ Dans les deux sections d'analyse, vérifier si l'option ON est sélectionnée pour Colour Compensation et que le même fichier de compensation colorimétrique MycAssay CC a été appliqué aux deux voies.

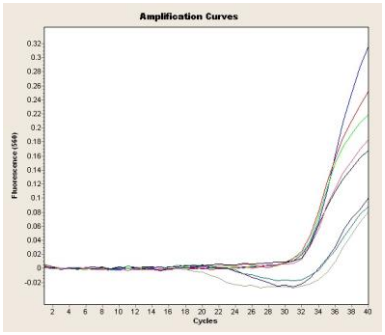
**4.7 Les valeurs de base de certains échantillons sont identiques à celles du témoin négatif, indiquant que l'amplification n'a pas eu lieu. Toutefois, le logiciel indique une valeur de Cp positive (comme illustré ci-dessous) :**

- Lors des études de validation, sur les 154 réactions négatives réalisées, une valeur de Cp positive pour un tracé d'amplification négatif a été observée à deux reprises seulement.

→ Si cela se produit, répéter l'analyse de l'échantillon afin de confirmer le résultat *négatif*.



**4.8 Lors de l'application du fichier de compensation colorimétrique, certaines des valeurs de la voie IAC 560 chutent, si bien que les valeurs de Cp correspondantes se trouvent en dehors de la plage acceptable :**




- Ce phénomène est tout à fait normal pour les réactions à forte concentration en ADN cible et n'a aucune conséquence sur l'interprétation des résultats du patient.

→ Suivre l'analyse normale. Pour les échantillons positifs pour Aspergillus, les résultats de l'IAC ne sont pas nécessaires à la pose d'un diagnostic pour le patient.

**4.9 Aucune voie ne donne de résultat pour aucun des échantillons ni des témoins :**

- Les conditions de conservation du kit ne sont pas conformes aux instructions de la section « Conservation » du mode d'emploi ou le kit a atteint sa date d'expiration.

→ Vérifier que le kit a été conservé dans de bonnes conditions. Vérifier la date d'expiration des réactifs (sur la boîte du kit ou l'étiquette des sachets) et, si nécessaire, répéter l'analyse avec un kit encore valable.

- L'automate ne fonctionne pas de façon optimale.

→ Vérifier que l'entretien et l'étalonnage de l'automate de PCR en temps réel sont à jour, conformément aux instructions du guide d'installation et de maintenance.

- La configuration du logiciel a été faite avec un fichier de mode opératoire incorrect.

→ Se reporter à la Section 2 et sélectionner le fichier de mode opératoire correct sur le CD-ROM de mode opératoire Myconostica, tel qu'indiqué pour chaque version du logiciel. Seul le fichier compatible avec le logiciel peut être chargé. Répéter l'analyse avec le fichier de mode opératoire correct.

Pour toute question ou en cas de problème, contacter le Service d'assistance technique (productsupport@lab21.com).

## Caractéristiques de performance et limites

Le kit a initialement été validé à l'aide de l'automate Cepheid SmartCycler®. Certaines revendications de performances du test ont été validées à nouveau sur l'automate LightCycler® 2.0 à l'aide de capillaires de verre (Roche réf. 04929292001 et 11909339001), comme indiqué ci-dessous. Lorsqu'il a été estimé que les différences entre les automates n'affectent pas les performances du test, ni, par conséquent, la revendication, l'étude n'a pas été répétée. Ces résultats, obtenus sur l'automate SmartCycler®, sont considérés transférables à l'automate LightCycler® 2.0.

## Sensibilité analytique

À partir du mode opératoire pour l'automate LightCycler® 2.0 décrit ci-dessus et des matrices de PCR générées par Myconostica, la limite du blanc déterminée pour le test MycAssay™ Aspergillus correspond à Cp = 39,0 tandis que le seuil de détection déterminé avec la souche AF293 d'*Aspergillus fumigatus* est < 25 copies de l'ADN cible.

## Sélectivité analytique

L'ADN génomique extrait de *Pénicillium* spp. donne également des résultats positifs. Cela s'explique par le fait que les séquences des cibles moléculaires sont très similaires entre *Aspergillus* et *Pénicillium*. Par conséquent, il est à noter qu'un résultat positif avec ce test peut provenir d'une infection à *Pénicillium* plutôt qu'une infection à *Aspergillus*.

La sélectivité analytique a été évaluée à l'aide d'ADN extrait de diverses espèces fongiques et non fongiques. Les espèces suivantes n'ont pas donné de résultat positif :
*Blastomyces capitatus, Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, Cladosporium spp., Cryptococcus neoformans, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Rhizomucor pusillus, Rhodotonila rubra, Saccharomyces cerevisiae, Scedosporium apiospermum, S. prolificans, Sporothrix schenkii, Trichosporon capitatum.* Les espèces bactériennes suivantes n'ont pas donné de résultat positif : *Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Lactobacillus plantarum, Legionella pneumophila, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, S. pyogenes, S. salivarius*.

L'ADN humain et les 3 espèces suivantes, *Pneumocystis jirovecii, Histoplasma capsulatum* et *Alternaria alternata*, n'ont pas été testés sur l'automate LightCycler® 2.0 mais l'ont été sur le SmartCycler®. Ces 3 espèces ont donné un résultat négatif avec le test.

## Reproductibilité et répétabilité

La répétabilité et la reproductibilité du test ont été déterminées par quatre opérateurs qui ont analysé un ensemble de sept matrices en trois exemplaires chacune, soit au total 168 tests. Les expériences ont été menées sur un lot de fabrication du kit MycAssay™ Aspergillus, sur deux automates situés sur deux sites au Royaume-Uni.

Les résultats ont été comparés à la limite du blanc et à la valeur limite clinique. À une concentration égale à six fois le seuil de détection, 100 % des échantillons ont donné des résultats conformes à la limite du blanc (résultats positifs) et 87,5% des échantillons ont donné des résultats conformes à la valeur limite clinique. À des concentrations supérieures à six fois le seuil de détection, 100 % des échantillons présentaient des résultats conformes à la valeur limite clinique et à la limite du blanc.

## Transfert de la valeur limite clinique

La valeur limite clinique de 36,0 a été déterminée sur l'automate SmartCycler®. Cette valeur limite a été transférée analytiquement à l'automate LightCycler® 2.0 à l'aide d'une matrice dont la concentration en *Aspergillus* a permis d'obtenir un taux de résultats positifs ≥ 95 % à la valeur limite clinique sur l'automate SmartCycler®. Une valeur de Cp de 37,0 a été déterminée puis confirmée à l'aide de trois matrices de concentration différente.

## Performances établies à l'aide de l'automate Cepheid SmartCycler®

### Substances interférentes (contre-indications)

Les composés suivants ont été analysés à des concentrations pertinentes du point de vue clinique et déterminés comme non inhibiteurs du test : acétylcystéine, amphotéricine, dipropionate de béclométasone, budésonide, colistiméthate sodique, propionate de fluticasone, fumarate de formotérol dihydraté, bromure d'ipratropium, lidocaïne, mannitol, sulfate de salbutamol, salmétérol, chlorure de sodium, cromoglicate de sodium, terbutaline, tobramycine.

### Évaluation des performances

Des échantillons respiratoires (LBA) prélevés dans deux hôpitaux, dont l'ADN a été extrait avec le kit MycXtra™ puis qui ont été congelés, ont servi à évaluer les performances du kit MycAssay™ Aspergillus avec les échantillons cliniques. Les résultats ont été comparés à la fois au diagnostic clinique et à la culture.

La valeur limite de Ct = 36,0 a été déterminée suite au passage en revue d'un ensemble de données d'échantillons issus de différents sites et prélevés sur différentes populations de patients. La probabilité de différenciation entre la maladie et l'état sain a été évaluée avec plusieurs valeurs limites.

**Comparaison entre la PCR et le diagnostic clinique**

| | Diagnostic clinique positif | Diagnostic clinique négatif | | |
|---|---|---|---|---|
| PCR positive | 31 | 1 | 0,97 | VPP |
| PCR négative | 2 | 10 | 0,83 | VPN |
| | 0,94 | 0,91 | | |
| | Sensibilité | Spécificité | | |

**Comparaison entre la PCR et la culture d'*Aspergillus***

| | Culture positive | Culture négative | | |
|---|---|---|---|---|
| PCR positive | 29 | 3 | 0,91 | VPP |
| PCR négative | 2 | 10 | 0,83 | VPN |
| | 0,94 | 0,77 | | |
| | Sensibilité | Spécificité | | |

Parmi les échantillons analysés, 0,8 % contiennent des inhibiteurs de la PCR suite à l'extraction à l'aide du kit MycXtra®, comme indiqué par l'IAC.

### Rapport clinique

Le kit MycAssay™ Aspergillus est destiné à servir d'aide au diagnostic. Les résultats doivent être considérés dans le contexte de l'état clinique du patient et en association avec les résultats d'autres tests de diagnostic.

Il est recommandé d'employer la phraséologie suivante dans le rapport, en fonction de l'interprétation des résultats du test.

Résultat 1
« *Aspergillus* spp. non détecté. »

Résultat 2
« *Aspergillus* spp. détecté. Résultat positif. Ce test est également susceptible de détecter *Pénicillium* spp. »

Résultat 3
« Échec du test, présence d'inhibiteurs ou d'une autre substance inconnue. »

### Limites du mode opératoire

- La principale limite de ce mode opératoire est liée à la qualité de l'échantillon primaire.
  - Si l'échantillon est très petit ou n'a pas été prélevé dans la zone affectée du poumon, le test peut se révéler moins sensible et donner un résultat faussement négatif.
  - Il convient de centrifuger les échantillons de LBA avant extraction de l'ADN du culot.

- Les données ont également montré qu'une diminution, lors de l'étape de centrifugation, du volume de surnageant utilisé pour l'extraction réduit la proportion d'inhibiteurs pénétrant dans le système.

- Il est possible d'obtenir des résultats faussement positifs si l'agent infectieux est *Pénicillium* spp. car celui-ci ne peut pas être différencié d'*Aspergillus* spp. avec ce kit.

- Bien que le procédé d'extraction d'ADN fongique MycXtra™ soit conçu pour éliminer les inhibiteurs de la PCR, tous les médicaments et toutes les populations de patients n'ont pas été évalués.

- Ce mode opératoire n'a pas été évalué de manière approfondie sur les expectorations et n'a pas non plus été évalué sur les échantillons provoqués dans le sérum physiologique ni sur des échantillons prélevés sur des enfants.

- Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus en cas de contamination externe de l'échantillon initial ou du test, par exemple par de l'air contenant de l'*Aspergillus*, par une mauvaise technique de manipulation du témoin positif ou par contamination externe (en particulier de la pipette) par l'ADN d'*Aspergillus*.

- Dans la mesure où un résultat vraiment positif peut être obtenu avec des échantillons de patients colonisés temporairement ou en permanence par *Aspergillus* spp., le résultat du test doit être interprété cliniquement dans le contexte de la maladie.

## LICENCE

TopTaq™ Hot Start est fourni par QIAGEN. QIAGEN® est une marque déposée de Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne.

Ce produit est vendu sous licence par le Public Health Research Institute (PHRI), Newark, New Jersey, États-Unis et il est sous protection de la propriété intellectuelle du PHRI. Son utilisation se limite au diagnostic humain *in vitro*.

SmartCycler® est une marque déposée de Cepheid, 904 Caribbean Drive, Sunnyvale, Californie, 94089, États-Unis.

Une partie de ce produit est soumis à une autorisation exclusive d'exploitation de brevet en instance, détenu par le Fred Hutchinson Cancer Centre, Seattle, États-Unis.

LightCycler® est une marque déposée de Roche Diagnostics, GmbH.

IVD

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882
Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

CE